

**DELPHION****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)[My Account](#)Search: [Quick/Number](#) [Boolean](#) [Advanced](#) [Der](#)**Derwent Record**[Er](#)View: [Expand Details](#) Go to: [Delphion Integrated View](#)Tools: [Add to Work File](#) [Create new Worl](#)Derwent Title: **New transformed microbe useful for the production of monoterpene**Original Title: ☒ **JP2000245482A2: PRODUCTION OF MONOTERPENE AND MICROORGANISM THEREFOR**Assignee: **SOZOTEKI SEIBUTSU KOGAKU KENKYUSHO KK Non-standard company**Inventor: **None**Accession/Update: **2000-642026 / 200062**IPC Code: **C12N 15/09 ; C12N 1/21 ; C12P 5/00 ;**Derwent Classes: **D16; E15;**Manual Codes: **D05-C(Chemicals by fermentation (biosynthesis) [others; general.]) , D05-C03G(Ligases (synthetases) by fermentation) , D05-H04(Newly discovered, testing of, isolation of, identification of and detection of bacteria) , E10-E04F(Other monohydric alcohol, production) , E10-J02A1(-C-triple-bond-C-, cycloaliphatic ring system present, production) , E10-J02C3(Aliphatic olefinic hydrocarbons - other production methods)**Derwent Abstract: **(JP2000245482A2) Novelty** - A transformed microbe which has a gene encoding a polypeptide having geranyl diphosphate synthase activity and a monoterpene synthase gene and produces monoterpene synthesized by said monoterpene synthase.**Detailed Description** - An INDEPENDENT CLAIM is also included for a method for the production of monoterpene in which the above microbe is cultured and the monoterpene produced is recovered.**Use** - The microbe can be used for the production of various monoterpenes useful in industry.

Dwg.0/3

Family:

| PDF Patent  | Pub. Date           | Derwent Update | Pages     | Language       | IPC Code          |
|---|---------------------|----------------|-----------|----------------|-------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP2000245482A2</b> | <b>* 2000-09-12</b> | <b>200062</b>  | <b>15</b> | <b>English</b> | <b>C12N 15/09</b> |
| Local appls.: .....                                       |                     |                |           |                |                   |

Priority Number:

| Application Number              | Filed      | Original Title                                       |
|---------------------------------|------------|--|
| <a href="#">JP1999000059431</a> | 1999-03-05 | PRODUCTION OF MONOTERPENE AND MICROORGANISM THEREFOR |

Chemical Indexing Codes: [Show chemical indexing codes](#)

Ring Index [Show ring index numbers](#)  
Numbers:

Specific [Show specific compounds](#)  
Compound  
Numbers:

Registry **02[M3]:0427P 0427U**  
Numbers: **03[M3]:0780P 0780U**  
**04[M3]:0477P 0477U**  
**08[M3]:1081U**  
**09[M3]:0245U**

Unlinked **0245U 0427P 0427U 0477P 0477U 0780P 0780U 1081U 1738U**  
Registry Numbers:

Related  
Accessions:

| Accession Number | Type | Derwent Update | Derwent Title |
|------------------|------|----------------|---------------|
| C2000-194024     | C    |                |               |
| 1 item found     |      |                |               |

Title Terms: **NEW TRANSFORM MICROBE USEFUL PRODUCE**

[Pricing](#) [Current charges](#)

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>Derwent Searches:</b> | <a href="#">Boolean</a>   <a href="#">Accession/Number</a>   <a href="#">Advanced</a> |
|--------------------------|---|

Data copyright Thomson Derwent 2003

**THOMSON**



Copyright © 1997-2005 The Tho

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact U](#)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-245482

(P2000-245482A)

(43) 公開日 平成12年9月12日 (2000.9.12)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I           | テ-マコード* (参考)      |
|---------------------------|-------|---------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A 4 B 0 2 4 |
| 1/21                      |       | 1/21          | 4 B 0 6 4         |
| C 1 2 P 5/00              |       | C 1 2 P 5/00  | 4 B 0 6 5         |

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 15 頁)

|           |                      |          |   |
|-----------|----------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願平11-59431          | (71) 出願人 | 599031191<br>株式会社創造的生物工学研究所<br>宮城県仙台市宮城野区清水沼3丁目3番45号<br>オアシスコート111号 |
| (22) 出願日  | 平成11年3月5日 (1999.3.5) | (72) 発明者 | 及川 胤昭<br>宮城県仙台市宮城野区清水沼3-3-45<br>オアシスコート111号                         |
|           |                      | (72) 発明者 | 広岡 和丈<br>宮城県仙台市太白区八木山本町2-4-1<br>ホワイトメゾン402号                         |
|           |                      | (74) 代理人 | 100088546<br>弁理士 谷川 英次郎   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノテルペンの生産方法及びそのための微生物

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子工学的手法により、微生物によりモノテルペンを十分な量生産する方法及びそのための形質転換微生物を提供すること。

【解決手段】 グラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と、モノテルペン合成酵素遺伝子とを有し、該モノテルペン合成酵素により合成されるモノテルペンを産生する形質転換微生物を提供した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と、モノテルペン合成酵素遺伝子とを有し、該モノテルペン合成酵素により合成されるモノテルペンを産生する形質転換微生物。

【請求項 2】 前記ゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と、モノテルペン合成酵素遺伝子とは、異なる組換えベクター中に存在し、前記形質転換微生物は、これら 2 種類の組換えベクターにより共形質転換されたものである請求項 1 記載の微生物。

【請求項 3】 前記微生物は大腸菌である請求項 1 又は 2 記載の微生物。

【請求項 4】 前記ゲラニルニリン酸合成酵素活性を有する酵素をコードする遺伝子は、ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の微生物。

【請求項 5】 前記ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子は、配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のうち 1 若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に 1 若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列であって、ゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するものをコードする請求項 4 記載の微生物。

【請求項 6】 前記ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子は、配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項 5 記載の微生物。

【請求項 7】 前記ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子は、配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の 8 2 位のセリンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチドをコードするものである、請求項 5 記載の微生物。

【請求項 8】 前記モノテルペン合成酵素遺伝子は、リモネン合成酵素遺伝子である請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の微生物。

【請求項 9】 前記リモネン合成酵素遺伝子は、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のうち 1 若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に 1 若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列であって、リモネン合成酵素活性を有するものをコードする請求項 8 記載の微生物。

【請求項 10】 前記リモネン合成酵素遺伝子は、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードする請求項 9 記載の微生物。

【請求項 11】 請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の微生物を培養し、生産されたモノテルペンを回収することから成る、モノテルペンの生産方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子工学的手法によるモノテルペンの生産方法及びそれに用いられる形質転換微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】モノテルペンとはジメチルアリルニリン酸とイソペンテニルニリン酸が縮合した、炭素 10 個を持つイソブレン則に従う化合物の総称である。多くの植物の葉・花・実より得られる香料、精油の成分および昆虫のフェロモンの一部などが知られる。モノテルペンの薬理的性質は殺菌、防虫および鎮痛などの作用や、アロマセラピー薬としての効能を有する。従って、モノテルペンを生産することは病原微生物や病害虫の駆除のための薬品や鎮痛剤の開発および芳香剤の開発に応用できる。

【0003】このような、工業的に有用なモノテルペンを生産するために、遺伝子工学的手法により、大腸菌等の微生物を用いて大量生産することができれば有利であることは言うまでもない。従来より、リモネン合成酵素遺伝子等のモノテルペン合成酵素遺伝子のいくつかは公知であり (Colby, S. M., Alonso, W. R., Katahira, E. J., McGavey, D. J., and Croteau, R. (1993) 4S-Limonene Synthase from the Oil Glands of Spearmint (*Mentha spicata*). J. Biol. Chem. 268, pp.23016-23024)、クローニングされているものもある。しかしながら、このようにクローニングされたモノテルペン合成酵素遺伝子を発現ベクターに組み込んで大腸菌等の宿主微生物を形質転換しても、得られた形質転換微生物は、目的とするモノテルペンを生産しない。このため、モノテルペンを生産する形質転換微生物は未だに得られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、遺伝子工学的手法により、微生物によりモノテルペンを十分な量生産する方法及びそのための形質転換微生物を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、モノテルペン合成酵素遺伝子を含む組換えベクターで形質転換された微生物が該モノテルペンを生産しないのは、モノテルペンの前駆体であるゲラニルニリン酸の濃度が宿主微生物細胞中で低いためであることに想到した。ゲラニルニリン酸を生成するゲラニルニリン酸合成酵素が、植物で部分精製されたことが報告されている (Hiede, L. and Berger, U. (1989) Partial purification and Properties of Geranyl Pyrophosphate Synthase from *Lithospermum erythrorhizon* Cell Cultures. Archiv. Biochem. Biophys. 273, 331-338) もの、ゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子は未だに同定されていない。本願発明者らは、C15 のファルネシルニリン酸を生成するファルネシルニリン酸合成酵素が C10 のゲラニルニリン酸

を生成するグラニルニリン酸合成酵素活性をも有することを見出した。そして、このようなグラニルニリン酸合成酵素活性を有する遺伝子と、モノテルペン合成酵素遺伝子とを宿主微生物に導入することにより、目的とするモノテルペンを産生する形質転換微生物が得られることを想到し、実際にモノテルペン産生形質転換微生物を作製することに成功し、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、グラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と、モノテルペン合成酵素遺伝子とを有し、該モノテルペン合成酵素により合成されるモノテルペンを産生する形質転換微生物を提供する。また、本発明は、上記本発明の微生物を培養し、生産されたモノテルペンを回収することから成る、モノテルペンの生産方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】上記のように、本発明の形質転換微生物は、グラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と、モノテルペン合成酵素遺伝子とを有する。

【0008】ここで、グラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドは、グラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドであればよく、グラニルニリン酸合成酵素と呼ばれる酵素のみならず、他の酵素名で呼ばれている酵素等も包含される。例えば、下記の実施例では、C15のファルネシルニリン酸を合成する、ファルネシルニリン酸合成酵素をコードする遺伝子を用いているが、ファルネシルニリン酸合成酵素はグラニルニリン酸合成酵素活性をも有するので、このような酵素も用いることができる。

【0009】グラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列の好ましい例を配列表の配列番号1に示す。配列番号1に示される塩基配列は、*Bacillus stearothermophilus*由来のファルネシルニリン酸合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列である。

【0010】グラニルニリン酸合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、又は該アミノ酸配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列であって、グラニルニリン酸合成酵素活性を有するものをコードする遺伝子も用いることができる。ここで、これらの修飾遺伝子の塩基配列は、配列番号1に記載された塩基配列と70%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有していることが好ましい。また、これらの修飾遺伝子は、配列番号1で示される塩基配列を有する核酸と、ストリンジェントな条件下(すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5% SDS又は0.1% SDSといった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて50~65℃)でハ

イブリダイズするものであることが好ましい。

【0011】このような修飾遺伝子の具体例として、配列番号1に示されるアミノ酸配列の82位のセリンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチドをコードするもの(コドンtctがttcに置換されたもの)を挙げることができる。このような遺伝子を用いた実施例が下記に記載されている。

【0012】以上から明らかなように、本明細書において「遺伝子」(下記のモノテルペン合成酵素遺伝子の場合も同様)とは、天然の遺伝子のみならず、これに人為的に変異を導入したものも含まれる。また、「遺伝子」は、DNAやRNAのような核酸のみならず、人工的な修飾核酸を含むものや、核酸と同様にアミノ酸配列をコードすることができる他の物質を含むものであってもよい。

【0013】なお、配列番号1で示される塩基配列を有する遺伝子は、*Bacillus stearothermophilus*のゲノムに含まれており、また、その塩基配列が配列番号1に示されているので、*Bacillus stearothermophilus*のゲノムを鋳型としたPCR等により容易に調製することができる。

【0014】本発明で用いられるモノテルペン合成酵素遺伝子は、所望のモノテルペンを合成するいずれの酵素の遺伝子であってもよい。ここで、モノテルペンとしては、いずれのモノテルペンでもよく、例えば、リモネン、リナロール、グラニオール、1,8-シネオール、ボルネオール、 $\alpha$ -ビネン、 $\beta$ -ビネン、ミルセン等を挙げることができる。

【0015】好ましいモノテルペン合成酵素遺伝子として、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を挙げることができる。配列番号2に示されるアミノ酸配列は、スベアミント由来のリモネン合成酵素のアミノ酸配列であり、配列番号2に記載された塩基配列は、スベアミント由来のリモネン合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列である。なお、配列番号2に示されるスベアミントのリモネン合成酵素遺伝子の塩基配列及びそれによりコードされるアミノ酸配列は、従来から報告されている(Colbyら、上掲)スベアミントのリモネン合成酵素遺伝子の塩基配列及びそれによりコードされるアミノ酸配列と異なっており、新規なものである。

【0016】モノテルペン合成酵素をコードする遺伝子としては、配列番号2に示されるアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、又は該アミノ酸配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列であって、モノテルペン合成酵素活性を有するものをコードする遺伝子も用いることができる。ここで、これらの修飾遺伝子の塩基配列は、配列番号2に記載された塩基配列と70%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有していることが好ましい。また、これ

らの修飾遺伝子は、配列番号1で示される塩基配列を有する核酸と、ストリンジェントな条件下(すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5% SDS又は0.1% SDSといった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて50~65℃)でハイブリダイズするものであることが好ましい。

【0017】なお、配列番号2で示される塩基配列を有する遺伝子は、スベアミントの葉から常法であるRT-PCR(1具体例が下記実施例に記載)により容易に調製することができる。

【0018】上記2種類の遺伝子を発現ベクターに組み込み、得られた組換えベクターで宿主微生物を形質転換することにより、本発明の形質転換微生物を得ることができる。2種類の遺伝子は、同一の発現ベクターに組み込んでもよいし、別々の発現ベクターに組み込み、両組換えベクターにより共形質転換を行ってもよい。なお、宿主微生物が、これら2種類の遺伝子のうち、いずれか一方を有し、かつ、その発現量がモノテルペンの生産にとって満足できる程度に十分である場合には、上記2種類の遺伝子のうち、不足している方の遺伝子を含む発現ベクターだけをを用いて形質転換を行ってもよい。

【0019】利用できる発現ベクターとしては、プロモーター下流にあるクローニング部位に挿入された外来遺伝子を宿主細胞内で発現することができるものであればいずれのものであってもよい。一般的に、このような発現ベクターは、宿主細胞内で複製するための複製開始点と、宿主細胞内での外来遺伝子の発現を可能にするプロモーターと、該プロモーターの下流に外来遺伝子を挿入するための少なくとも1つの制限酵素部位とを少なくとも有し、さらに、好ましくは、ベクターの選択を可能にする、薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーと、外来遺伝子挿入部位の下流に転写を終結させるターミネーターと、さらに原核生物用のベクターでは、好ましくは外来遺伝子の挿入部位とプロモーターの間にSD配列を有する。各種の宿主微生物について種々の発現ベクターが市販されているので、それらの市販の発現ベクターを本発明において利用することができる。

【0020】宿主微生物としては、上記形質転換によりモノテルペンを産生することができるいずれの微生物であってもよい。好ましい宿主微生物の例として、大腸菌、*Pseudomonas*属、*Bacillus*属、酵母、かび等を挙げることができ、特に大腸菌が好ましい。

【0021】形質転換操作自体はこの分野において周知であり、用いる宿主細胞及び発現ベクターに相応しい方法を適宜選択して用いることができる。例えば、下記実施例に記載したように、宿主が大腸菌の場合には、塩化カルシウム法等を用いることができる。

【0022】形質転換操作後、用いた発現ベクターの選択マーカーに基づいて形質転換体を選択し、さらに、所望のモノテルペンを生産しているクローンを選択するこ

とにより、本発明の形質転換体を得ることができる。

【0023】上記のようにして得られる形質転換微生物を培養し、目的のモノテルペンを回収する。微生物の培養方法自体は、各微生物について公知の培養方法を用いて行うことができる。また、生産されたモノテルペンは、宿主微生物及び用いた発現ベクターの性質に応じ、菌体内又は培養上清から回収することができる。回収したモノテルペンは、必要に応じ、クロマトグラフィー等の常法により精製又は部分精製することができる。

10 【0024】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0025】2-1 スベアミントからリモネン合成遺伝子のクローニング

下記の実験の一般的な遺伝子操作の手技は断わりのない限り、J.Sambrookらの方法(Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring harbor, NY)に従った。

20 【0026】2-1-1 トータルRNAの調製

以下の方法により、トータルRNAを調製した。

1) 屋内で栽培した新鮮なスベアミント(*Mentha spicata*)の葉50 gを乳鉢に入れ、液体窒素を加えながら乳棒ですりつぶして破碎する。

2) 破碎物を2本の10 ml容の遠心管に分けて入れ、7.5 mlの抽出用バッファー(4.2M グアニジンチオシアネート、26.4 mM クエン酸三ナトリウム、0.53% ギャラクシジン、100mM 2-メルカプトエタノール)を加えて懸濁する。

30 3) 4℃, 3,000 rpm, 10分遠心する。

4) 上清を10本の1.5ml容の遠心チューブに分注し、4℃, 15,000 rpm, 10分遠心する。

5) 上清を6本の3.5 ml容の超遠心チューブに移し、これに1mlのRNA cusion(5.7M 塩化セシウム, 10 mM EDTA (pH8.0), 0.1% ジエチルピロカーボネート(DEPC))を加える。

6) 20℃, 80,000 rpm, 2時間遠心する。

7) 上層を除く、次に界面付近を3回抽出用バッファーで洗い、界面に浮かんでいる不純物を除く。その後、下層を除く。

8) 沈澱物を400μlの0.1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)に溶解し、等量のフェノール:クロロホルム(1:1)混合液を加え、良く混合する。室温, 15,000rpm, 3分遠心し、上清を別のチューブに移す。400μlのエノール:クロロホルム(1:1)混合液を加え、繰り返す。

9) 40μlの酢酸ナトリウム(pH5.2)と880μlのエタノールを加え、良く混合する。

10) 4℃, 15,000 rpm, 15分遠心する。

50 11) 上清を捨て、400μlの-20℃冷70%エタノールを加

え、4℃、15,000 rpm、3分遠心する。

12) エタノールを良く除き、沈澱物を40 μlの0.1%DEPCを含むH<sub>2</sub>Oに溶解する。

13) 1 μlを電気泳動してRNAを確認する。また、OD260 nmで濃度を測定する。

#### 【0027】2-1-2 poly(A)<sup>+</sup> RNAの調製

poly(A)<sup>+</sup> RNAの調製はoligotex-dT 30 (super) (日本合成ゴム+日本ロッシュ社製)を用いて、下記のように行った。

1) 1.5 ml 容遠心チューブに 12 μg/ 95 μlのトータルRNAと600 μlのoligotex-dT 30 (super)を加え、良く混合し、65℃で5分加温する。

2) 氷中で3分冷却する。

3) 70 μlの 5M NaClを加え良く混合し、37℃で10分インキュベートする。

4) 室温、15,000rpm、3分遠心する。

5) 上清を取り除き、沈澱物を500 μlのNS buffer (0.5 M NaCl, 0.1% SDS, 0.1%DEPC)で懸濁する。その後、37℃で5分インキュベートする。

6) 室温、15,000rpm、3分遠心する。

7) 上清を取り除き、沈澱物を200 μlの0.1% DEPCを含むH<sub>2</sub>Oで懸濁する。

8) 65℃で5分インキュベートする。その後、氷中で3分冷却する。

9) 室温、15,000rpm、3分遠心する。

10) 上清を回収し、8)、9)を繰り返す。沈澱は200 μlの0.1% DEPCを含むH<sub>2</sub>Oで懸濁し、同様に8)、9)を繰り返す。

11) 上清を2回フェノール：クロロホルム抽出する。

12) 抽出後の上清に、20 μlの 1M酢酸ナトリウム (pH5.2) と440 μlのエタノールを加え、良く混合する。

13) 4℃、15,000 rpm、15分遠心する。

14) 上清を捨て、400 μlの-20℃冷70%エタノールを加え、4℃、15,000 rpm、3分遠心する。

15) エタノールを良く除き、沈澱物を30 μlの0.1%DEPCを含むH<sub>2</sub>Oに溶解する。これをmRNA溶液として、cDNA合成に用いた。

#### 【0028】2-1-3 cDNAの合成

cDNAの合成はZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社製)を用いて次のように行った。

##### 第一鎖DNAの合成

1) 1.5 ml 容遠心チューブに28 μlの3.8 μg mRNA溶液、5 μlの 10x 1st strand buffer、3 μlの第一鎖メチルヌクレオチド混合物、2 μlの1.4 μg / μlのリンカープライマー(5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTT-3')、7.5 μlのDEPC処理H<sub>2</sub>O、1 μlの40 units/μlのRNaseプロックリボヌクレアーゼ阻害剤)、を加え穏やかに混合する。

2) 室温で10分間放置し、プライマーと鋳型(上記で得

られたmRNA)をアニールさせる。

3) 3.5 μlの逆転写酵素MLV-RTase (200 U/μl)を加える。穏やかに混合する。

4) 37℃で1時間インキュベートする。

5) 反応液に20 μlの10x2nd strand buffer、第二鎖ヌクレオチド混合物、108.2 μlのH<sub>2</sub>O、3.5 μlのRnase H (0.9 U/μl)、10 μlのDNAポリメラーゼ(10 U/μl)を加え、16℃で90分インキュベートする。その後、ただちに氷中に置く。

6) 反応液に23 μlのBlunting dNTP mix、2 μlのクローン化Pfu DNAポリメラーゼ(2.5 units/μl)を加え、良く混合し、72℃で30分反応する。

7) 室温に戻し、200 μlのフェノール：クロロホルム(1:1)を加え、良く混合する。

8) 室温、15,000 rpm、2分遠心する。上清を別のチューブに移す。

9) 等量のクロロホルムを加え、良く混合する。

10) 室温、15,000 rpm、2分遠心する。上清を別のチューブに移す。

11) 20 μlの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)と400 μlのエタノールを加え良く混合する。その後、-20℃で一晩放置する。

12) 4℃、15,000 rpm、60分遠心する。

13) 上清を捨て、500 μlの80%エタノールを加え、室温、15,000 rpm、2分遠心する。

14) エタノールを良く取り除き、沈澱物を9 μlのEcoRI Adaptor溶液に溶解する。この内の1 μlをRT-PCRの鋳型に用いた。

#### 【0029】2-1-4 PCRによるリモネン合成酵素遺伝子のクローニング

PCR増幅とPCR産物の精製は下記の手順で行った。

1) スペアーマイントから作製したcDNAを鋳型にして、リモネン合成酵素遺伝子をクローニングするためのプライマーは以前Croteauらによって、クローニングされているリモネン合成遺伝子のリモネン合成酵素をコードしている5'末端シーケンスのS1プライマー：5'-ATGGCTCTCAAAGTGTAAAGTG-3'と3'末端シーケンスのS3プライマー：5'-TCATGCAAAGGGCTCGAATAAGGTTC-3'を用いて行った。

2) PCRは次の条件で行った。PCR反応は94℃で15秒、55℃で2秒、74℃で30秒を32サイクルで行った。各(アデノシン、チミン、グアノシン、シトシン)デオキシヌクレオチド三リン酸は終濃度が200 μMとなるように添加した。プライマーはS1およびS2をそれぞれ20 pmol用いた。MgCl<sub>2</sub>は終濃度が1 mMとなるように添加した。DNAポリメラーゼはKOD DNAポリメラーゼ(TOYOBO CO., LTD)を2.5単位用いた。cDNAは1 μl用いた。PCR反応液はH<sub>2</sub>Oによって、全量を50 μlに調整した。

3) PCR反応が終了した後、5 μlをアガロースゲル電気泳動してPCR産物を確認した。

4) 残りの反応液に355  $\mu$ l のH<sub>2</sub>Oを加え、さらに400  $\mu$ l のフェノール:クロロホルム(1:1)混合液を加え、良く混合する。室温,15,000rpm, 3分遠心し、上清を別のチューブに移す。

5) 40  $\mu$ l の3M 酢酸ナトリウム(pH5.2)と880  $\mu$ l のエタノールを加え、良く混合する。

6) 4°C, 15,000 rpm, 15分遠心する。

7) 上清を捨て、400  $\mu$ l の-20°C冷80%エタノールを加え、4°C, 15,000 rpm, 3分遠心する。

8) エタノールを良く取り除き、沈澱物を15  $\mu$ l のH<sub>2</sub>Oに溶解する。

9) 全量を電気泳動する。

10) 目的の大きさのバンドをカミソリで切り出し、1.5 ml 容遠心チューブに移し、Microcon (Amicon社)を用いて、ゲルからDNAを回収した。

【0030】2-1-5 PCR産物の5'末端リン酸化  
次の方法により、PCR産物の5'末端リン酸化を行った。

1) ゲルから回収したDNA液100  $\mu$ lに、58  $\mu$ l のH<sub>2</sub>O, 40  $\mu$ l の5xキナーゼバッファー, 2  $\mu$ l のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(10 unit/ $\mu$ l)を加え、混合し、37°Cで30分インキュベートする。

2) ただちに、70°Cで10分インキュベートして酵素を失活させた。

3) 200  $\mu$ l のH<sub>2</sub>Oを加え、さらに400  $\mu$ l のフェノール:クロロホルム(1:1)混合液を加え、良く混合する。室温,15,000rpm, 3分遠心し、上清を別のチューブに移す。

4) 40  $\mu$ l の3M 酢酸ナトリウム(pH5.2)と880  $\mu$ l のエタノールを加え、良く混合する。

6) 4°C, 15,000 rpm, 15分遠心する。

7) 上清を捨て、400  $\mu$ l の-20°C冷80%エタノールを加え、4°C, 15,000 rpm, 3分遠心する。

8) エタノールを良く取り除き、沈澱物を10  $\mu$ l のH<sub>2</sub>Oに溶解する。この内の5  $\mu$ lをライゲーションのインサートとして用いた。

【0031】2-1-6 ライゲーションおよびトランスフォーメーション

1) プラスミドベクターはpBluescript II SK<sup>+</sup>(STRATAGENE社製)をEcoRVで消化した後、アルカリンフォスファターゼ処理して脱リン酸化したものをを用いた。これをpSK/EcoRVと略す。

2) 氷中で1.5 ml 容遠心チューブに1  $\mu$ l のpSK/EcoRV(20 ng), 5  $\mu$ l のリン酸化したPCR産物, 3  $\mu$ l の ligation high (TOYOBO社製)を加え、16°Cで2時間反応させた。

3) 反応液に74  $\mu$ l のH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l の 10 xKCM (1M KCl, 0.3M CaCl<sub>2</sub>, 0.5M MgCl<sub>2</sub>), 7  $\mu$ l の30%ポリエチレングリコールを加え、混合する。

4) 100  $\mu$ l のコンピテント細胞大腸菌DH5 $\alpha$  (Bethesda Researchより市販)を加えて混合し、氷中20分放置す

る。

5) 室温で10分放置する。

6) 1 ml の1xLB 培地を加え、37°Cで1時間インキュベートする。

7) 終濃度が50  $\mu$ g/mlのアンピシリン入りの1xLB寒天プレートに適量塗抹し、37°Cで一晩インキュベートする。

【0032】2-1-7 プラスミドの調製と制限酵素による切断およびサブクローニング

リモネン合成酵素遺伝子を含むプラスミドの調製と制限酵素による切断およびサブクローニングは次のようにして行った。

1) トランスフォーメーションによって得られた単一のコロニーを白金耳で取り、10 ml入りのアンピシリン入りの1xLB培地に植え、37°Cで一晩振とう培養した。

2) プラスミドの調製はアルカリ法またはwizard plasmid preparation kit (PROMEGA社)を用いて行った。

3) 調製したプラスミドを各種制限酵素で切断し、制限酵素切断地図を作製した。また、各種酵素による切断片はアガロースゲル電気泳動によって、分離し、ゲルからそれぞれの断片を回収し、再環化または別のプラスミドベクターに挿入し、大腸菌によってサブクローニングした。

【0033】2-1-8 塩基配列の決定

クローニングされたリモネン合成酵素遺伝子の塩基配列を次のようにして決定した。

1) サブクローニングによって得られた大腸菌より、プラスミドを調製した。

2) 調製したプラスミドはDye terminator cycle sequencing kit (パーキンエルマーABI社)を用いて、シーケンシング反応を行った。

3) シーケンシング反応を行ったサンプルはGenetic analyzer 310 (パーキンエルマーABI社製)を用いて、塩基配列を決定した。

4) 決定した塩基配列は遺伝情報解析ソフトウェア Genetix MAC ver.9(ソフトウェア開発(株)社)を用いて解析した。決定された塩基配列及びそれがコードする推定アミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。なお、得られたリモネン合成酵素遺伝子の塩基配列を、Colby (上掲)らによりクローニングされたスベアミントのリモネン合成酵素遺伝子の塩基配列と比較すると、42塩基異なっており、アミノ酸配列でも15アミノ酸残基が異なっていた。よって、本実施例でクローニングされたリモネン合成酵素遺伝子及びそれがコードするリモネン合成酵素はいずれも新規のものである。

【0034】2-2 リモネン合成酵素活性の測定

2-2-1 リモネン生産性プラスミドの構築

リモネン生産のために、リモネン合成遺伝子の基質となるゲラニルニリン酸を合成することが実験的に確認されている遺伝子と、本研究でクローニングされたリモネン



合成遺伝子を共発現するプラスミドの構築は次のように行った。

【0035】 *Bacillus stearothermophilus* (ATCCより市販、受託番号ATCC 10149)から、ファルネシル二リン酸合成酵素遺伝子(BSFPPs)を調製し、プラスミドpTV118N(宝酒造株式会社より市販)に組み込んで組換えベクターを調製した。これは、Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T and Ogura K. (1993) *Thermostable Farnesyl Diphosphate Synthase of Bacillus stearothermophilus: Molecular Cloning, Sequence Determination, Overproduction, and Purification*. *J. Biochem.* 113, 355-363に記載された方法により行った。すなわち、*Bacillus stearothermophilus* ATCC 10149のゲノムDNAを鋳型とし、プライマーとして次の配列、すなわち、5'-GAGGAGGAGTAAGCCATGCCGACGCTTCA-3'及び5'-CGACATTAAAGCTTAACGCCGCCCTTG-3'を有する2種類のオリゴヌクレオチドを用い、常法によりPCRを行ってBSFPPsを増幅し、増幅されたBSFPPsをプラスミドpTV118NのNco I, Hind III部位に挿入して組換えベクター(pTV118N+Wild-BSFPPs)を構築した。得られたBSFPPsの塩基配列及びそれがコードする推定アミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0036】 pTV118N+Mutant-BSFPPsの構築はKunkel法によってpTV118N+Wild-BSFPPsに部位特異的に変異を導入する方法によって作製された。Kunkel法に用いる試薬はキット化されて市販されているMutan K(宝酒造)を用いた。

1. プラスミドpTV118N+Wild-BSFPPsは大腸菌CJ236 [F', dut<sup>-</sup>, ung<sup>-</sup>] (宝酒造株式会社より市販)に導入した。

2. 一本鎖DNAは、その形質転換体にバクテリオファージM13K07を感染させて調製した。(結果として調製されたDNAにはデオキシウラシル(du)が導入される。)

3. 調製した一本鎖DNAは5'末端をリン酸化させたオリゴヌクレオチドDNAプライマー(S82F) 5'-CATACGTACTTCTTGATTCATGATGATTTG-3'とアニーリングさせた(このプライマーには野生型の82位のセリンTCTがフェニルアラニンTCに置換される変異と変異体の識別のためにBspHI制限酵素サイトTCATGAがサイレント変異で導入されている)。

4. *E. coli* DNA リガーゼとT4 DNAポリメラーゼを用いて二本鎖化させた。

5. 二本鎖化されたDNAを用いて*E. coli* BMH71-18 mutSを形質転換させた。

6. 得られた形質転換体からプラスミドを調製した(pTV118N+Mutant-BSFPPs)。制限酵素BspHIによって切断し変異の導入されたクローンの識別を行った。

7. プラスミドのBSFPPsをコードする領域の全塩基配列を決定し、変異の導入の有無を確認した。その結果、配

列番号2に示す野生型BSFPPsの82位のセリンTCTがフェニルアラニンTTCに置換されており、他の部分は配列番号2に示す通りであった。

【0037】 pTV118N+Wild-BSFPPs およびpTV118N+Mutant-BSFPPsをそれぞれ二箇所切断する酵素Pvu IIで切断し、これをアガロースゲル電気泳動して、DNA断片を分離し、BSFPPsをコードする断片を回収した。この断片をプラスミドpACYC184(株式会社日本ジーンより市販)のScaIサイトに挿入した(この際方向の異なる二種類のプラスミドが得られた。以下で、遺伝子の働く向きが時計回りに挿入されたプラスミドは-rを付けて呼び、反時計回りに挿入されたプラスミドは-lを付けて呼ぶ。野生型と変異型でそれぞれ生じた二つのプラスミドはpACYC184+Wild-BSFPPs-r, pACYC184+Wild-BSFPPs-l, pACYC184+Mutant-BSFPPs-r, pACYC184+Mutant-BSFPPs-lと名前を付けて実験に用いた。上記の操作を図1に模式的に示す。

【0038】 次にそれぞれのプラスミドを大腸菌DH5αに導入した。これら形質転換された大腸菌にリモネン合成遺伝子の挿入されたプラスミドpBluescript II SK<sup>+</sup> + limoneneを導入した。従って、すべての大腸菌は二種類のプラスミドを保有する。コントロールとして、pACYC184ベクターとBluescript II SK<sup>+</sup>ベクターの二つのプラスミドを用いて形質転換されたDH5α(下記のJ株)を用いた。

【0039】 これらの形質転換体はそれぞれ A株(DH5α/pACYC184+Wild-BSFPPs-r and pBluescript II SK<sup>+</sup> + limonene (この表示は、大腸菌DH5αの菌体内にプラスミドpACYC184+Wild-BSFPPs-rとプラスミドpBluescript II SK<sup>+</sup> + limoneneとを含んでいることを意味する、以下、同様)、B株(DH5α/pACYC184+Wild-BSFPPs-r and pBluescript II SK<sup>+</sup>), C株(DH5α/pACYC184+Wild-BSFPPs-l and pBluescript II SK<sup>+</sup> + limonene), D株(DH5α/pACYC184+Wild-BSFPPs-l and pBluescript II SK<sup>+</sup>), E株(DH5α/pACYC184+Mutant-BSFPPs-r and pBluescript II SK<sup>+</sup> + limonene), F株(DH5α/pACYC184+Mutant-BSFPPs-r and pBluescript II SK<sup>+</sup>), G株(DH5α/pACYC184+Mutant-BSFPPs-l and pBluescript II SK<sup>+</sup> + limonene), H株(DH5α/pACYC184+Mutant-BSFPPs-l and pBluescript II SK<sup>+</sup>), I株(DH5α/pACYC184 and pBluescript II SK<sup>+</sup> + limonene), J株(DH5α/pACYC184 and pBluescript II SK<sup>+</sup>)と名前を付けて実験に用いた。

【0040】 2-2-2 リモネン合成酵素アッセイ  
リモネン合成酵素の酵素活性の分析はSteeleの方法(Steele, C.L., Crock, J., Bohlmann J., and Croteau, R. (1998) *Sesquiterpene Synthases from Grand Fir (Abies grandis)*. *J. Biol. Chem.* 273, 2078-2089)を参考に、下記のように行った。

1) -85 °Cで30%グリセロール溶液に保存しておいた、リモネン生産性プラスミドを保有する大腸菌を60μg/m

1) のアンピシリンおよび10 mq/mlテトラサイクリン入りの1xLB寒天プレートに白金耳で画線して植菌し、37℃で20 時間程度培養する。

2) 単一のコロニーを白金耳でかき取り、60 μg/mlのアンピシリンおよび10 mq/mlテトラサイクリン入りの10 ml 1xLB 液体培地に植え30℃で一晩振とう培養する。

3) 翌日1M IPTGを10 μl添加し、さらに一晩振とう培養培養する。

4) 12 ml容の遠心チューブに全量に移し、4℃, 3000 rpm, 5 分遠心して集菌する。

5) 培地を捨て、菌体を20 mM Tris-HCl (pH7.5)に懸濁する。

6) 菌体を1ml の超音波処理用バッファー (20 mM MOPS (pH7.0), 1mM EDTA, 1mM DTT, 10 % (v/v)グリセロールで再懸濁し、超音波細胞破碎機を用いて、細胞を破碎する。

7) 破碎物を1.5 ml 容遠心チューブに移し、4 °C, 1500 0 rpm, 20 分遠心する。

8) この上清を粗抽出物としてリモネン合成酵素アッセイに用いた。

9) リモネン合成酵素アッセイは次の二通りの反応液を用いて行った。1. 終濃度がそれぞれ20 mM β-ヒドロキシ-4-ホルリンプロパンスルホン酸: MOPSO(pH7.0), 10%グリセロール (v/v), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 μM [1-<sup>3</sup>H] ゲラニルニリン酸 (GPP), 40 μlの粗抽出物, H<sub>2</sub>Oで1mlに調節した反応液。 2. 終濃度がそれぞれ20 mM MOPSO (pH7.0), 10%グリセロール (v/v), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 μMジメチルアリルニリン酸 (DM APP), 5 μM [1-<sup>3</sup>C] イソペンテニルニリン酸 (IPP), 40 μlの粗抽出物, H<sub>2</sub>Oで1mlに調節した反応液。

10) 反応液はねじ口のキャップの付いた10 ml容ガラス製遠心チューブに加えて混合し、酵素産物が気散しないように1mlのペンタンを重層する。

11) 30 °Cで3 時間インキュベートする。

12) 1ml のペンタンを加え、良く混合し、室温, 3,000 rpm, 10 分遠心する。

13) 予め、流出口の内側に綿栓をした1 ml 容プラスチックシリンジに薄層クロマト用プレートKiesel gel 60F 254 (メルク社) から書き取ったシリカゲル粉末と無水硫酸マグネシウムを加え満たす。このシリンジにペンタンを加え、遠心して洗う。この操作をもう一度繰り返す。このシリンジに遠心後の500 μlのペンタン層を加え、そしてシリンジを10 ml 容遠心チューブに差し込

\* ぬ。300 μlのペンタンをシリンジに加え、室温, 3,000 rpm, 10 分遠心する。

14) 遠心チューブに回収された溶液を、液体シンチレーションカウンターにかけ放射線活性を測定する。

【0041】2-3 遺伝子組換え大腸菌によるリモネンの生産

リモネン合成遺伝子を導入した遺伝子組換え大腸菌を用いたリモネンの生産を分析する方法は下記の手順で行った。

10) 1) -85℃でグリセロール溶液に保存してあるリモネン生産性プラスミドを保有する組換え体A株、C株、E株およびC株は100 μg/ml の濃度のアンピシリンおよびテトラサイクリン入りのLB寒天培地に白金耳で画線して植菌し、37℃で一晩静置培養した。

2) 単一のコロニーを白金耳で取り、アンピシリンおよびテトラサイクリン入り10 mlのLB液体培地に植え、37 °Cで一晩振とう培養した。

3) 500 μlの培養液を新しい50 ml入りのLB培地に植え継ぎ、OD600 nmが 0.2になるまで30 °Cで振とう培養した。

20) 4) 100 mM IPTGを150 μl加え、さらに30 °Cで3 時間振とう培養した。

5) 培養液を50 ml 容の遠心管に移し、4 °C, 5,000 rpm, 5 分遠心して集菌した。

6) 培地を捨て、菌体は次の操作まで-85 °Cで凍結保存した。

7) 2 ml のTEバッファーを加え、菌体を懸濁した。

8) 2 mlの 10 mq/mlのリゾチームを加え、氷中で10 分静置した。

30) 9) 0.4 gのNaClを加え、ボルテックスミキサーで良く混合した。

10) 2 mlのジクロロメタンを加え、2 分ボルテックスミキサーで良く混合した。

11) 室温, 3,000 rpm, 5 分遠心した。

12) 下層を2 ml 容のマイクロチューブに移し、0.1 gの無水硫酸ナトリウムを加え、ボルテックスミキサーで良く混合し、その後10 分放置する。

13) 軽く遠心して落とし、バイアルビンに移し、キャップを付け、パラフィルムを巻く。

40) 14) バイアルビンに移したサンプルはガスクロマトグラフ分析にかけけるまで、4℃で保存した。

【0042】2-4 リモネンのガスクロマトグラフ分析分析機械および分析条件は下記の通りに行った。

|       |  |
|-------|--|
| 使用機械  | 島津ガスクロマトグラフGC-17AFAw ver.3             |
| カラム   | DB-WAX(0.53 mm x 30 m 1.0 μm)          |
| 検出器   | w-FID                                  |
| 分析法   | スプリット法                                 |
| 試料注入量 | 1.0 μl                                 |
| 温度    | カラム温度 50 °C(0min)-10 °C/min-220(0 min) |
| 注入口温度 | 200 °C                                 |

検出器温度 250 °C

## 【0043】3 結果

1) リモネン生産性遺伝子組換え大腸菌からの粗酵素液を用いたリモネン合成酵素活性の測定の結果、クローン化したリモネン合成遺伝子が導入されているすべての大腸菌株(A, C, E, G, I) にリモネン合成酵素活性が示された。しかし、リモネン合成遺伝子が導入されていない大腸菌J 株にはその活性は示されなかった。2) リモネン合成酵素活性はリモネン合成遺伝子と変異型FPP合成遺伝子を導入した大腸菌E株とC株がともに高く、ついでリモネン合成遺伝子とpIV118N ベクターを導入した大腸菌A株とI株が高かった。次にFPP合成遺伝子の変異体遺伝子を導入した大腸菌AとC株が高かった(図2)。

3) ガスクロマト分析の結果は、すべてのリモネン合成遺伝子の導入されたリモネン生産性大腸菌株にリモネンが検出された(図3)。従って、本方法によって、初め\*

\* 遺伝子組換え大腸菌を用いてリモネンを生産する方法が確立された。

4) リモネン生産量はC 株が最も高く、次いでA, E, Gの順に生産量が高かった(図3)。

## 【0044】

【発明の効果】本発明により、モノテルペンを生産する形質転換微生物が初めて提供された。本発明の微生物を用いることにより、産業上有用な種々のモノテルペンを工業的に大量に生産することができる。また、本発明の形質転換微生物は、モノテルペン合成酵素を産生するので、これからモノテルペン合成酵素を回収してin vitroでモノテルペンを生産することも可能である。

## 【0045】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Sozoteki Seibutsu Kogaku Kenkyujo Co., Ltd.  
 <120> Method for Producing Monoterpene and Microorganism Producing the Same  
 <130> 99587  
 <160> 8

<210> 1  
 <211> 894  
 <212> DNA  
 <213> Bacillus stearothermophilus  
 <400> 1

|   |     |
|---|-----|
| atg gcg cag ctt tca gtt gaa cag ttt ctc aac gag caa aaa cag gcg | 48  |
| Met Ala Gln Leu Ser Val Glu Gln Phe Leu Asn Glu Gln Lys Gln Ala |     |
| 1 5 10 15   |     |
| gtg gaa aca gcg ctc tcc cgt tat ata gag cgc tta gaa ggg ccg gcg | 96  |
| Val Glu Thr Ala Leu Ser Arg Tyr Ile Glu Arg Leu Glu Gly Pro Ala |     |
| 20 25 30  |     |
| aaq ctg aaa aaq gcg atg gcg tac tca ttg gag gcc ggc ggc aaa cga | 144 |
| Lys Leu Lys Lys Ala Met Ala Tyr Ser Leu Glu Ala Gly Gly Lys Arg |     |
| 35 40 45  |     |
| atc cgt ccg ttg ctg ctt ctg tcc acc gtt ccg gcg ctc ggc aaa gac | 192 |
| Ile Arg Pro Leu Leu Leu Ser Thr Val Arg Ala Leu Gly Lys Asp     |     |
| 50 55 60  |     |
| ccg gcg gtc gga ttg ccc gtc gcc tgc gcg att gaa atg atc cat acg | 240 |
| Pro Ala Val Gly Leu Pro Val Ala Cys Ala Ile Glu Met Ile His Thr |     |
| 65 70 75 80   |     |
| tac tct ttg atc cat gat gat ttg ccg agc atg gac aac gat gat ttg | 288 |
| Tyr Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ser Met Asp Asn Asp Asp Leu |     |
| 85 90 95  |     |
| cgg cgc ggc aaq ccg acg aac cat aaa gtg ttc ggc gag gcg atg gcc | 336 |
| Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Phe Gly Glu Ala Met Ala |     |
| 100 105 110   |     |
| atc ttg gcg ggg gac ggg ttg ttg acg tac gcg ttt caa ttg atc acc | 384 |

## 【0046】

| 17  | 18  |
|---|-----|
| Ile Leu Ala Gly Asp Gly Leu Leu Thr Tyr Ala Phe Gln Leu Ile Thr |     |
| 115 120 125   |     |
| gaa atc gac gat gag cgc atc cct cct tcc gtc cgg ctt cgg ctc atc | 432 |
| Glu Ile Asp Asp Glu Arg Ile Pro Pro Ser Val Arg Leu Arg Leu Ile |     |
| 130 135 140   |     |
| gaa cgg ctg gcg aaa gcg gcc ggt ccg gaa ggg atg gtc gcc ggt caq | 480 |
| Glu Arg Leu Ala Lys Ala Ala Gly Pro Glu Gly Met Val Ala Gly Gln |     |
| 145 150 155 160   |     |
| gca gcc gat atg gaa gga gag ggg aaa acg ctg acg ctt tcg gag ctc | 528 |
| Ala Ala Asp Met Glu Gly Glu Gly Lys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Leu |     |
| 165 170 175   |     |
| gaa tac att cat cgg cat aaa acc ggg aaa atg ctg caa tac agc gtg | 576 |
| Glu Tyr Ile His Arg His Lys Thr Gly Lys Met Leu Gln Tyr Ser Val |     |
| 180 185 190   |     |
| cac gcc ggc gcc ttg atc ggc ggc gct gat gcc cgg caa acg cgg gag | 624 |
| His Ala Gly Ala Leu Ile Gly Gly Ala Asp Ala Arg Gln Thr Arg Glu |     |
| 195 200 205   |     |
| ctt gac gaa ttc gcc gcc cat cta ggc ctt gcc ttt caa att cgc gat | 672 |
| Leu Asp Glu Phe Ala Ala His Leu Gly Leu Ala Phe Gln Ile Arg Asp |     |
| 210 215 220   |     |
| gat att ctc gat att gaa ggg gca gaa gaa aaa atc ggc aag ccg gtc | 720 |
| Asp Ile Leu Asp Ile Glu Gly Ala Glu Glu Lys Ile Gly Lys Pro Val |     |
| 225 230 235 240   |     |
| ggc agc gac caa agc aac aac aaa gcg acg tat cca gcg ttg ctg tcg | 768 |
| Gly Ser Asp Gln Ser Asn Asn Lys Ala Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Ser |     |
| 245 250 255   |     |
| ctt gcc ggc gcg aag gaa aag ttg gcg ttc cat atc gag gcg gcg caq | 816 |
| Leu Ala Gly Ala Lys Glu Lys Leu Ala Phe His Ile Glu Ala Ala Gln |     |
| 260 265 270   |     |
| cgc cat tta cgg aac gcc gac gtt gac ggc gcc gcg ctc gcc tat att | 864 |
| Arg His Leu Arg Asn Ala Asp Val Asp Gly Ala Ala Leu Ala Tyr Ile |     |
| 275 280 285   |     |
| tgc gaa ctg gtc gcc gcc cgc gac cat taa                         | 894 |
| Cys Glu Leu Val Ala Ala Arg Asp His                             |     |
| 290 295   |     |

[0047]

|   |     |
|---|-----|
| <210> 2   |     |
| <211> 1800  |     |
| <212> DNA   |     |
| <213> Mentha spicata  |     |
| <400> 2   |     |
| atg gct ctc aaa gtg tta agt gtt gca act caa atg gcg att cct agc | 48  |
| Met Ala Leu Lys Val Leu Ser Val Ala Thr Gln Met Ala Ile Pro Ser |     |
| 1 5 10 15   |     |
| aag cta acg aga tgt ctt cca ccc tca cac ttg aaa tct tct cca aaa | 96  |
| Lys Leu Thr Arg Cys Leu Pro Pro Ser His Leu Lys Ser Ser Pro Lys |     |
| 20 25 30  |     |
| ttg tta tct agc act aac agt agt agt cgg tct cgc ctc cgt gtg tat | 144 |
| Leu Leu Ser Ser Thr Asn Ser Ser Ser Arg Ser Arg Leu Arg Val Tyr |     |
| 35 40 45  |     |

| 19  | 20  |
|---|-----|
| tgc tcc tcc tcg caa ctc act act gag aga cga tcc gga aac tac aac | 192 |
| Cys Ser Ser Ser Gln Leu Thr Thr Glu Arg Arg Ser Gly Asn Tyr Asn |     |
| 50 55 60  |     |
| cct tct cgt tgg gat gtc gaa ttc atc caa tcc ctc cac agt gat tat | 240 |
| Pro Ser Arg Trp Asp Val Glu Phe Ile Gln Ser Leu His Ser Asp Tyr |     |
| 65 70 75 80   |     |
| gag gag gac aaa cac gcg att agg gct tct gag ctg gtc act ttg gtg | 288 |
| Glu Glu Asp Lys His Ala Ile Arg Ala Ser Glu Leu Val Thr Leu Val |     |
| 85 90 95  |     |
| aag atg gaa ttg gag aaa gaa acg gat cat att cga caa ctt gag ttg | 336 |
| Lys Met Glu Leu Glu Lys Glu Thr Asp His Ile Arg Gln Leu Glu Leu |     |
| 100 105 110   |     |
| atc gat gac tta cag agg atg ggg ctg tcc gat cat ttc cag aat gag | 384 |
| Ile Asp Asp Leu Gln Arg Met Gly Leu Ser Asp His Phe Gln Asn Glu |     |
| 115 120 125   |     |
| ttc aaa gaa atc ttg tcc tct ata tat ctc gac cat cac tat tac aag | 432 |
| Phe Lys Glu Ile Leu Ser Ser Ile Tyr Leu Asp His His Tyr Tyr Lys |     |
| 130 135 140   |     |
| aac cct ttt cca aaa gaa gaa agg gat ctc tac tcc aca tct ctt gca | 480 |
| Asn Pro Phe Pro Lys Glu Glu Arg Asp Leu Tyr Ser Thr Ser Leu Ala |     |
| 145 150 155 160   |     |
| ttt agg ctc ctc aga gaa cat ggt ttt caa gtc gca caa gag gta ttc | 528 |
| Phe Arg Leu Leu Arg Glu His Gly Phe Gln Val Ala Gln Glu Val Phe |     |
| 165 170 175   |     |
| gac agt ttc aag aac gag gag ggt gag ttc aaa gaa agc ctt agc gac | 576 |
| Asp Ser Phe Lys Asn Glu Glu Gly Glu Phe Lys Glu Ser Leu Ser Asp |     |
| 180 185 190   |     |
| gac act aaa gga ttg ttg caa ctg tat gaa gct tcc ttt ctg ttg acg | 624 |
| Asp Thr Lys Gly Leu Leu Gln Leu Tyr Glu Ala Ser Phe Leu Leu Thr |     |
| 195 200 205   |     |
| gaa ggc gaa acc acg ctc gag tca gcg agg gaa ttc gcc acc aaa ttt | 672 |
| Glu Gly Glu Thr Thr Leu Glu Ser Ala Arg Glu Phe Ala Thr Lys Phe |     |
| 210 215 220   |     |
| ttg gag gaa aga gtg aac gag ggt ggt gtt gat ggc gac ctt tta aca | 720 |
| Leu Glu Glu Arg Val Asn Glu Gly Gly Val Asp Gly Asp Leu Leu Thr |     |
| 225 230 235 240   |     |
| aga atc gca tat tct ttg gac atc cca ctt cat tgg agg gtt aaa agg | 768 |
| Arg Ile Ala Tyr Ser Leu Asp Ile Pro Leu His Trp Arg Val Lys Arg |     |
| 245 250 255   |     |
| cca aat gca cct gcg tgg atc gaa tgg tat agg aag agg ccc gac atg | 816 |
| Pro Asn Ala Pro Ala Trp Ile Glu Trp Tyr Arg Lys Arg Pro Asp Met |     |
| 260 265 270   |     |
| aat cca gta gtg ttg gag ctt gcc ata ctc gac tta aat att gtt caa | 864 |
| Asn Pro Val Val Leu Glu Leu Ala Ile Leu Asp Leu Asn Ile Val Gln |     |
| 275 280 285   |     |
| gca caa ttt caa gaa gag ctc aaa gaa tcc ttc agg tgg tgg aga aat | 912 |
| Ala Gln Phe Gln Glu Glu Leu Lys Glu Ser Phe Arg Trp Trp Arg Asn |     |
| 290 295 300   |     |
| act ggt ttt gtt gag aag ctg ccc ttc gca agg gat aga ttg gtg gaa | 960 |
| Thr Gly Phe Val Glu Lys Leu Pro Phe Ala Arg Asp Arg Leu Val Glu |     |

| 21  | 22   |
|---|------|
| 305   | 320  |
| tgc tac ttt tgg aat act ggg atc atc gag cca cgt cag cat gca agt | 1008 |
| Cys Tyr Phe Trp Asn Thr Gly Ile Ile Glu Pro Arg Gln His Ala Ser |      |
| 325   | 330  |
| gca agg ata atg atg ggc aaa gtc aac gct ctg att acg gtg atc gat | 1056 |
| Ala Arg Ile Met Met Gly Lys Val Asn Ala Leu Ile Thr Val Ile Asp |      |
| 340   | 345  |
| gat att tat gat gtc tac ggc acc tta gaa gaa ctc gaa caa ttc aca | 1104 |
| Asp Ile Tyr Asp Val Tyr Gly Thr Leu Glu Glu Leu Glu Gln Phe Thr |      |
| 355   | 360  |
| gaa ctc att cgg aga tgg gat ata gac tca atc gac caa ctt ccc gat | 1152 |
| Glu Leu Ile Arg Arg Trp Asp Ile Asp Ser Ile Asp Gln Leu Pro Asp |      |
| 370   | 375  |
| tac atg caa ctg tgc ttt ctt gca ctc aac aac ttc gtc gat gat aca | 1200 |
| Tyr Met Gln Leu Cys Phe Leu Ala Leu Asn Asn Phe Val Asp Asp Thr |      |
| 385   | 390  |
| tcg tac gat gtt atg aag gag aaa ggc gtc aac gtt ata ccc tac ctg | 1248 |
| Ser Tyr Asp Val Met Lys Glu Lys Gly Val Asn Val Ile Pro Tyr Leu |      |
| 405   | 410  |
| cgg caa tcg tgg gtg gat ttg gcg gat aag tat atg gta gag gca cgg | 1296 |
| Arg Gln Ser Trp Val Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Met Val Glu Ala Arg |      |
| 420   | 425  |
| tgg ttc tac ggc gga cac aaa cca agt ttg gaa gag tat ttg gag aac | 1344 |
| Trp Phe Tyr Gly Gly His Lys Pro Ser Leu Glu Glu Tyr Leu Glu Asn |      |
| 435   | 440  |
| tca tgg cag tcg ata agt ggg ccc tgt atg tta acg cac ata ttc ttc | 1392 |
| Ser Trp Gln Ser Ile Ser Gly Pro Cys Met Leu Thr His Ile Phe Phe |      |
| 450   | 455  |
| cga gta aca gat tcg ttc aca aag gag acc gtc gac agt ttg tac aaa | 1440 |
| Arg Val Thr Asp Ser Phe Thr Lys Glu Thr Val Asp Ser Leu Tyr Lys |      |
| 465   | 470  |
| tac cac gat tta gtt cgc tgg tca tcc ttc gtt ctg cgg ctt gct gac | 1488 |
| Tyr His Asp Leu Val Arg Trp Ser Ser Phe Val Leu Arg Leu Ala Asp |      |
| 485   | 490  |
| gat ctg gga acc tcg gtg gaa gag gtg agc aga ggc gat gtg ccg aaa | 1536 |
| Asp Leu Gly Thr Ser Val Glu Glu Val Ser Arg Gly Asp Val Pro Lys |      |
| 500   | 505  |
| tca ctt cag tgc tac atg agt gac tac gat gca tcg gag gcg gag gcg | 1584 |
| Ser Leu Gln Cys Tyr Met Ser Asp Tyr Asp Ala Ser Glu Ala Glu Ala |      |
| 515   | 520  |
| cgg aag cac gtg aaa tgg ctg ata gcg gag gtg tgg aag aag atg aat | 1632 |
| Arg Lys His Val Lys Trp Leu Ile Ala Glu Val Trp Lys Lys Met Asn |      |
| 530   | 535  |
| gcg gag agg gtg tcg aag gat tct cca ttt ggc aaa gat ttt ata gga | 1680 |
| Ala Glu Arg Val Ser Lys Asp Ser Pro Phe Gly Lys Asp Phe Ile Gly |      |
| 545   | 550  |
| tgt gca gtt gat tta gga agg atg gcg cag ttg atg tac cat aat gga | 1728 |
| Cys Ala Val Asp Leu Gly Arg Met Ala Gln Leu Met Tyr His Asn Gly |      |
| 565   | 570  |
| gat ggg cac ggc aca caa cat cct ata ata cat caa caa atg acc aga | 1776 |

23

24

Asp Gly His Gly Thr Gln His Pro Ile Ile His Gln Gln Met Thr Arg

580

585

590

acc tta ttc gag ccc ttt gca tga

1800

Thr Leu Phe Glu Pro Phe Ala

595

[0048]

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> linker primer used for preparing cDNA of *Mentha spicata*

&lt;400&gt; 3

gagagagaga gagagagaga actagtctcg agtttttttt tttttttttt 50

[0049]

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> primer used for amplifying by PCR limonene synthase cDNA from *Mentha spicata*

&lt;400&gt; 4

atggctctca aagtgttaag tg 22

[0050]

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> primer used for amplifying by PCR limonene synthase cDNA from *Mentha spicata*

&lt;400&gt; 5

tcatgcaaag ggctcgaata aggttc 26

[0051]

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer used for introducing mutation to farnesyl diphosphate synthase by site-specific mutagenesis

&lt;400&gt; 6

catacgtact tcttgattca tgatgatttg 30

[0052]

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

25

26

<223> primer used for amplifying farnesyl diphosphate synthase gene from  
*Bacillus stearothermophilus*

<400> 7

gaggaggagt aagccatggc gcagctttca

30

[0053]

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer used for amplifying farnesyl diphosphate synthase gene from  
*Bacillus stearothermophilus*

<400> 8

cgaccattaa aagcttaacg cccgccccttg

30

【図面の簡単な説明】

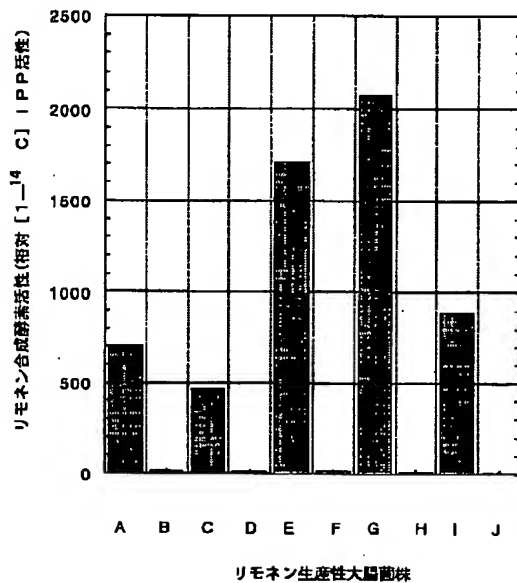
【図1】本発明の実施例において、ゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子を含む組換えベクターを構築した方法を模式的に示す図である。

\*

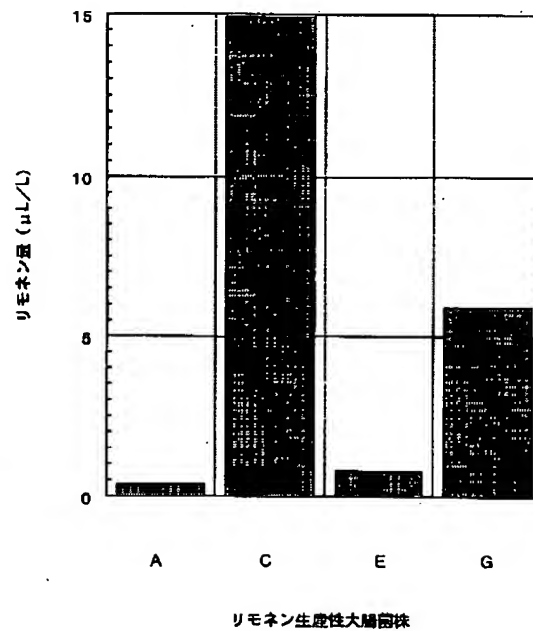
\*【図2】本発明の実施例において作製した各種形質転換微生物のリモネン合成酵素活性を示す図である。

【図3】本発明の実施例において作製した各種形質転換微生物のリモネン生産量を示す図である。

【図2】

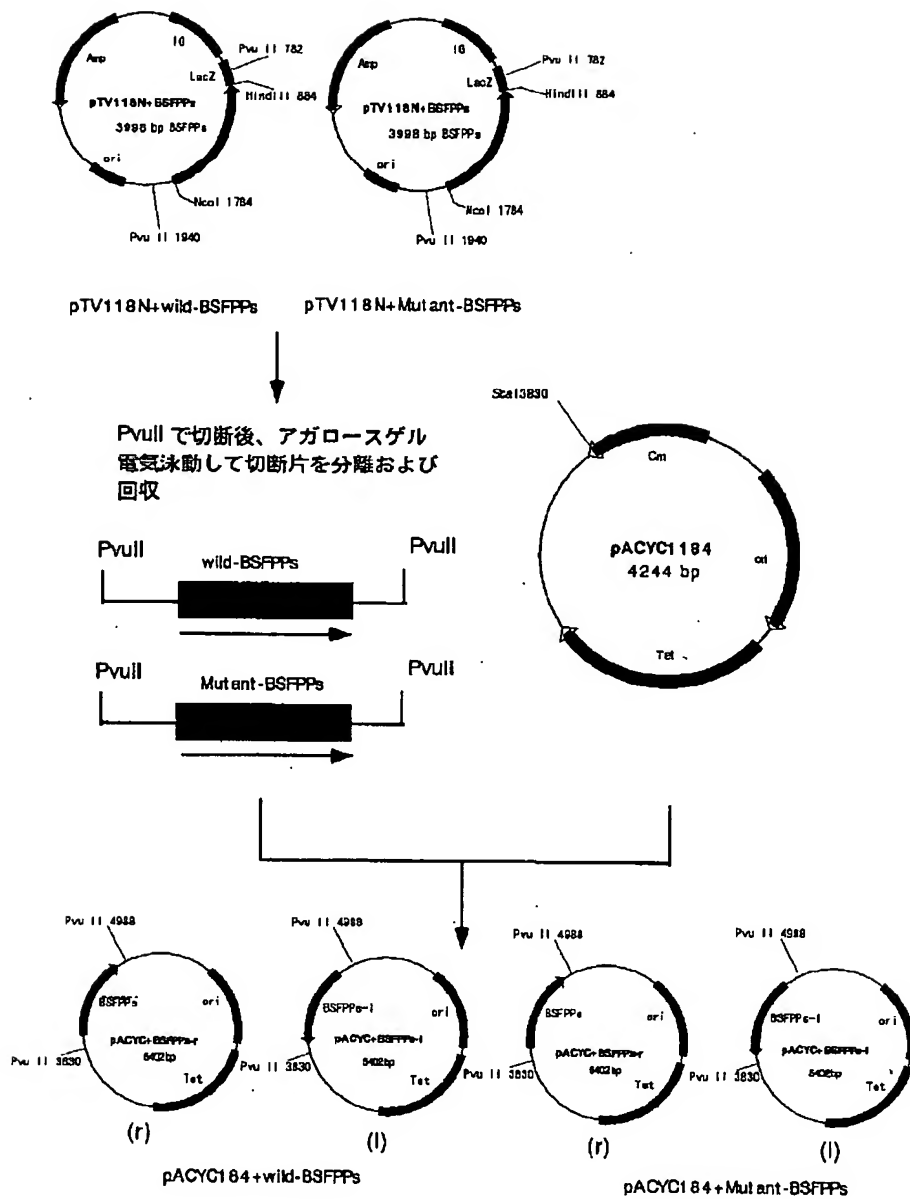


【図3】





【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 大沼 信一  
福島県福島市瀬の上町東町二丁目1-6

(72)発明者 西野 徳三  
宮城県仙台市青葉区南吉成二丁目15番地の  
3

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA07 BA10 BA80 CA04  
CA06 DA06 EA04 GA11 HA01  
4B064 AB01 AG01 CA02 CA19 CC24  
DA01 DA12  
4B065 AA18Y AA26X AA88Y AB01  
AC14 BA02 CA03 CA29 CA44  
CA47